



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 94194775.0

[43]公开日 1997 年 1 月 22 日

[11] 公开号 CN 1141000A

[22]申请日 94.11.4

[30]优先权

[32]93.11.5 [33]US[31]08 / 147,765

[86]国际申请 PCT / US94 / 12752 94.11.4

[87]国际公布 WO95 / 12410 英 95.5.11

[85]进入国家阶段日期 96.7.4

[71]申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72]发明人 C·C·塞芬格

D·L·施迈利

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 姜建成

权利要求书 3 页 说明书 12 页 附图页数 0 页

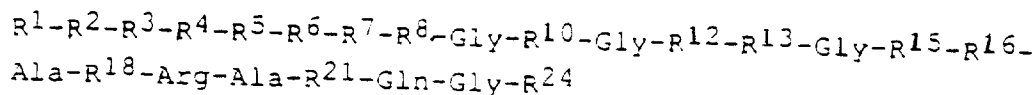
[54]发明名称 疫苗的设计和生

[57]摘要

由与细菌粘附于乳房易变形上皮细胞相关蛋白衍生的肽用于制备预防乳腺炎的疫苗。确定微生物粘附的方法提供了合理的疫苗设计。

# 权 利 要 求 书

1. 一种具有下述结构通式的乳腺炎疫苗:



其中R<sup>1</sup> 是氢或C<sub>1</sub> - C<sub>16</sub> 羧酸

$R^2$  是 Ala, Gly, Ser 或 丙酸

$R^3$  是 Val, Ile, Leu 或 D-Val;

R<sup>4</sup> 是 Lys 或 Arg;

R<sup>5</sup> 是 Val, Ile 或 Leu;

$R^6$  是 Ala, Gly 或 Ser;

R<sup>7</sup> 是 Ile, Leu 或 Val;

R<sup>8</sup> 是 Asp, Asn 或 Glu;

R<sup>10</sup> 是 Phe, Tyr 或 Trp;

R-2 是 Arg, Asn, Lys 或 His;

R<sup>13</sup> 是 Ile, Leu 或 Val;

R<sup>15</sup> 是 Arg, Asn, Lys 或 His;

R16 是 Leu, Ala, Ile 或 Val;

R<sup>13</sup> 是 Phe, Asn, Lys 或 His;

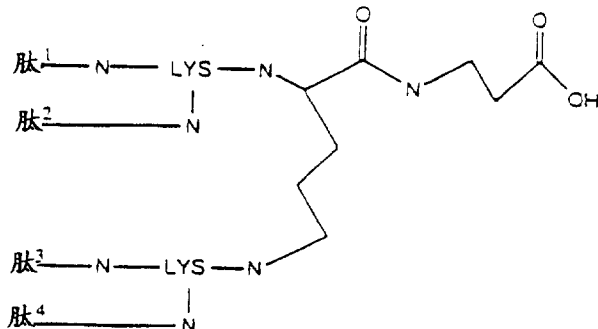
R<sup>21</sup> 是 Ile, Ala, Val 或 Leu; 和

R<sup>24</sup> 是 OH, Ala 或 Ser.

2. 权利要求 1 的乳腺炎疫苗肽, 其中

R<sup>2</sup> 是 Ala; R<sup>3</sup> 是 Val; R<sup>4</sup> 是 Lys; R<sup>5</sup> 是 Val; R<sup>6</sup> 是 Ala; R<sup>7</sup> 是 Ile; R<sup>8</sup> 是 Asp; R<sup>9</sup> 是 Gly; R<sup>10</sup> 是 Phe; R<sup>11</sup> 是 Gly; R<sup>12</sup> 是 Arg; R<sup>13</sup> 是 Ile; R<sup>15</sup> 是 Arg; R<sup>16</sup> 是 Leu; R<sup>18</sup> 是 Phe; R<sup>21</sup> 是 Ile; 和 R<sup>24</sup> 是 OH.

3. 一种具有下述通式的多抗原递呈肽:



其中, 肽<sup>1</sup>、肽<sup>2</sup>、肽<sup>3</sup>和肽<sup>4</sup>独立地选自于下式的化合物:

5           R<sup>1</sup>-R<sup>2</sup>-R<sup>3</sup>-R<sup>4</sup>-R<sup>5</sup>-R<sup>6</sup>-R<sup>7</sup>-R<sup>8</sup>-Gly-R<sup>10</sup>-Gly-R<sup>12</sup>-R<sup>13</sup>-Gly-R<sup>15</sup>-R<sup>16</sup>-  
Ala-R<sup>18</sup>-Arg-Ala-R<sup>21</sup>-Gln-Gly-R<sup>24</sup>

其中R<sup>1</sup> 是氢或C<sub>1</sub> - C<sub>16</sub> 羧酸

10           R<sup>2</sup> 是 Ala, Gly, Ser 或 丙酸  
R<sup>3</sup> 是 Val, Ile, Leu 或 D-Val;  
R<sup>4</sup> 是 Lys 或 Arg;  
R<sup>5</sup> 是 Val, Ile 或 Leu;  
R<sup>6</sup> 是 Ala, Gly 或 Ser;  
15           R<sup>7</sup> 是 Ile, Leu 或 Val;  
R<sup>8</sup> 是 Asp, Asn 或 Glu;  
R<sup>10</sup> 是 Phe, Tyr 或 Trp;  
R<sup>12</sup> 是 Arg, Asn, Lys 或 His;  
R<sup>13</sup> 是 Ile, Leu 或 Val;  
R<sup>15</sup> 是 Arg, Asn, Lys 或 His;  
20           R<sup>16</sup> 是 Leu, Ala, Ile 或 Val;  
R<sup>18</sup> 是 Phe, Asn, Lys 或 His;  
R<sup>21</sup> 是 Ile, Ala, Val 或 Leu;和  
R<sup>24</sup> 是 OH, Ala 或 Ser.

25           4. 权利要求3的多抗原递呈肽, 其中肽<sup>1</sup>、肽<sup>2</sup>、肽<sup>3</sup>和肽<sup>4</sup>各由下述化合物组成, 其中,

          R<sup>2</sup> 是 Ala; R<sup>3</sup> 是 Val; R<sup>4</sup> 是 Lys; R<sup>5</sup> 是 Val; R<sup>6</sup> 是 Ala; R<sup>7</sup>  
          是 Ile; R<sup>8</sup> 是 Asp; R<sup>9</sup> 是 Gly; R<sup>10</sup> 是 Phe; R<sup>11</sup> 是 Gly; R<sup>12</sup>  
          是 Arg; R<sup>13</sup> 是 Ile; R<sup>15</sup> 是 Arg; R<sup>16</sup> 是 Leu; R<sup>18</sup> 是 Phe; R<sup>21</sup>  
10           是 Ile, 和 R<sup>24</sup> 是 OH.

5. 一种佐剂中包含权利要求1化合物的药物制剂。

6. 一种佐剂中包含权利要求3化合物的药物制剂。

7. 一种确定参与粘附的分子的方法, 包括:

35           (a) 制备粘附性或非粘附性微生物变种的细胞壁或细胞膜提取物; 和  
          (b) 比较(a)步骤的提取物以确定存在于粘附性变种但不存在于非粘附

性变种的分子。

8. 权利要求 7 的方法，其中微生物是革兰氏阳性菌。
9. 权利要求 8 的革兰氏阳性菌，它是一种与乳腺炎有关的细菌。
10. 一种疫苗，它包含按权利要求 7 的方法鉴别的致免疫肽。

# 说明书

## 疫苗的设计和生产

5 本发明提供了确定微生物粘附机制的方法。微生物粘附基础的机制允许鉴别造成粘附的微生物分子，因而可设计用于预防或减少微生物粘附于细胞、医疗器械、假体等的疫苗。因此本发明属于免疫学和微生物学领域。

各种细菌和其它微生物粘附于特定的细胞类型以及植入器械例如假体、可植入去纤颤器、心脏起搏器、人工关节等，构成了治疗这类感染的主要临床障碍，许多这类粘附性生物的抗菌素或抗真菌剂抗药性使这一问题更加混乱。

10 本发明包括通过评价粘附性微生物和非粘附性微生物间细胞表面的差异来确定微生物粘附性质的方法。通过使用上述确定金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）类粘附于牛乳房上皮细胞（引起牛乳腺炎）的性质来说明本发明的可操作性和合乎需要性。本发明的乳腺炎疫苗（本发明的一个优选实施方案）是本发明疫苗的例证，它们是根据本发明的方法生产的。

15 已知有许多种革兰氏阳性菌引起乳腺炎。革兰氏阳性菌、例如链球菌（*Streptococci*）、葡萄球菌（*Staphylococci*）和棒状杆菌（*Corynebacteria*）属常作为乳腺炎的引发剂。微生物引起乳腺炎的倾向与微生物粘附于牛乳房的易变形（*ductile*）上皮细胞的能力相关。A. J. Frost, *Infection and Immunity*, 12:1554-1556 (1975)。

20 本发明的乳腺炎疫苗利用了微生物粘附于牛乳房易变形上皮细胞的能力与由此产生的发病机理间的相互关系。制备并提取细菌细胞壁，以确定粘附于易变形上皮细胞的细菌和对易变形上皮细胞缺乏粘附能力的细菌中特异蛋白的存在。然后利用存在于粘附性细菌但不存在于非粘附性细菌的蛋白产生肽的亚碎片，该碎片是本发明列举的乳腺炎疫苗的基础。

25 本发明提供了疫苗设计方法，通过制备细胞壁或细胞膜提取物，通过比较粘附与非粘附性微生物来确定粘附相关分子，对于粘附相关分子进行生化特性测定，使用这些信息合理设计疫苗，该疫苗引发免疫反应，而后干扰微生物的粘附能力。

本发明的一个优选实施方案提供了与细菌粘附于易变形的上皮细胞相关蛋白的肽亚碎片以及其式 I 的衍生形式：

30

### 式 I

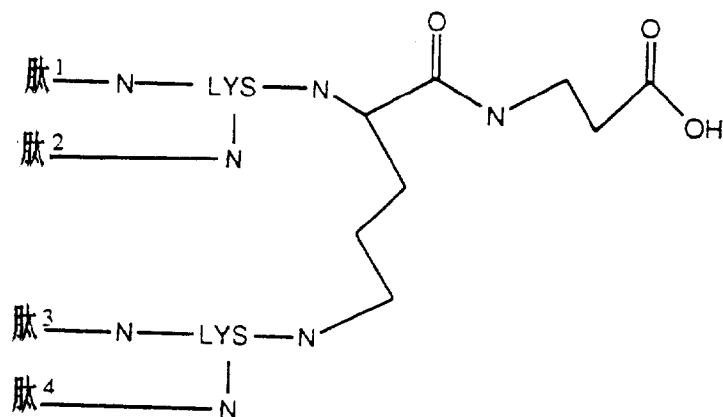
$$R^1-R^2-R^3-R^4-R^5-R^6-R^7-R^8-Gly-R^{10}-Gly-R^{12}-R^{13}-Gly-R^{15}-R^{16}-Ala-R^{18}-Arg-Ala-R^{21}-Gln-Gly-R^{24}$$

35 其中  $R^1$  是氢或  $C_1 - C_{16}$  羧酸

R<sup>2</sup> 是 Ala, Gly, Ser 或 丙酸  
 R<sup>3</sup> 是 Val, Ile, Leu 或 D-Val;  
 R<sup>4</sup> 是 Lys 或 Arg;  
 R<sup>5</sup> 是 Val, Ile 或 Leu;  
 R<sup>6</sup> 是 Ala, Gly 或 Ser;  
 R<sup>7</sup> 是 Ile, Leu 或 Val;  
 R<sup>8</sup> 是 Asp, Asn 或 Glu;  
 R<sup>10</sup> 是 Phe, Tyr 或 Trp;  
 R<sup>12</sup> 是 Arg, Asn, Lys 或 His;  
 R<sup>13</sup> 是 Ile, Leu 或 Val;  
 R<sup>15</sup> 是 Arg, Asn, Lys 或 His;  
 R<sup>16</sup> 是 Leu, Ala, Ile 或 Val;  
 R<sup>18</sup> 是 Phe, Asn, Lys 或 His;  
 R<sup>21</sup> 是 Ile, Ala, Val 或 Leu;  
 R<sup>24</sup> 是 OH, Ala 或 Ser.

本发明还提供了式 II 的多抗原递呈肽:

式 II



其中肽<sup>1</sup>、肽<sup>2</sup>、肽<sup>3</sup>、肽<sup>4</sup>独立地选自式 I 化合物。

本发明还提供了制剂中的肽和多抗原肽, 该制剂适于对所述肽和多抗原递呈肽引发最强免疫反应。

有效控制牛乳腺炎是重要的。患乳腺炎的产乳动物须用抗生素治疗, 使用抗生素治疗产乳动物导致牛奶中的抗生素浓度超出日前常规基准。因此, 开发对牛乳腺炎有效的疫苗具有重要的商业意义并且为兽医管理中消除抗生素治疗畜类乳腺炎的需要提供了可能。式 I 化合物

R<sup>1</sup>-R<sup>2</sup>-R<sup>3</sup>-R<sup>4</sup>-R<sup>5</sup>-R<sup>6</sup>-R<sup>7</sup>-R<sup>8</sup>-Gly-R<sup>10</sup>-Gly-R<sup>12</sup>-R<sup>13</sup>-Gly-R<sup>15</sup>-R<sup>16</sup>-  
 Ala-R<sup>18</sup>-Arg-Ala-R<sup>21</sup>-Gln-Gly-R<sup>24</sup>

其中

R<sup>1</sup> 是 羟基 或 C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub> 羧酸

R<sup>2</sup> 是 Ala, Gly, Ser 或 丙酸

5 R<sup>3</sup> 是 Val, Ile, Leu 或 D-Val;

R<sup>4</sup> 是 Lys 或 Arg;

R<sup>5</sup> 是 Val, Ile 或 Leu;

R<sup>6</sup> 是 Ala, Gly 或 Ser;

R<sup>7</sup> 是 Ile, Leu 或 Val;

R<sup>8</sup> 是 Asp, Asn 或 Glu;

10 R<sup>10</sup> 是 Phe, Tyr 或 Trp;

R<sup>12</sup> 是 Arg, Asn, Lys 或 His;

R<sup>13</sup> 是 Ile, Leu 或 Val;

R<sup>15</sup> 是 Arg, Asn, Lys 或 His;

R<sup>16</sup> 是 Leu, Ala, Ile 或 Val;

R<sup>18</sup> 是 Phe, Asn, Lys 或 His;

15 R<sup>21</sup> 是 Ile, Ala, Val 或 Leu;

R<sup>24</sup> 是 OH, Ala 或 Ser;

是在确定乳牛的乳腺炎病原剂粘附于乳房易变形上皮细胞的机理的广泛研究中得到的, 比较金黄色葡萄球菌菌株粘附于乳房易变形上皮组织的能力, 然后再将它们分入粘附菌株与非粘附菌株组。从粘附和非粘附金黄色葡萄球菌中提取外膜制品并比较, 发现存在于粘附菌株但不存在于非粘附菌株的蛋白。有三种蛋白存在于粘附菌株中但不存于非粘附菌株中。这些蛋白的分子量为 36KD、47KD 和 65KD。测定蛋白的生化特性并选择 36KD 蛋白为最有希望作为制备乳腺炎预防性疫苗的候选者。最终选择相应于 36KD 蛋白氨基端的 22 氨基酸肽为乳腺炎疫苗生产的最适致免疫的。为制备疫苗, 优选 22 氨基酸 N 末端的天然序列。因此, 式 I 中优选的氨基酸取代基如下: R<sup>1</sup> 是氢; R<sup>2</sup> 是 Ala; R<sup>3</sup> 是 Val; R<sup>4</sup> 是 Lys; R<sup>5</sup> 是 Val; R<sup>6</sup> 是 Ala; R<sup>7</sup> 是 Ile; R<sup>8</sup> 是 Asp; R<sup>9</sup> 是 Gly; R<sup>10</sup> 是 Phe; R<sup>11</sup> 是 Gly; R<sup>12</sup> 是 Arg; R<sup>13</sup> 是 Ile; R<sup>15</sup> 是 Arg; R<sup>16</sup> 是 Leu; R<sup>18</sup> 是 Phe; R<sup>21</sup> 是 Ile; 及 R<sup>24</sup> 是羟基。式 I 的其它可能的取代基可根据的具有相似功能基团的氨基酸的已知生化和免疫学性质来选择。本发明还包括式 I 化合物的致免疫的亚片段。式 II 的多抗原递呈肽允许表示式 I 的多种致免疫的肽, 因而可提供了能更有效地引发免疫应答的致免疫的亚单位的较大分子。在式 II 的多抗原递呈肽上表示的式 I 肽, 可以是相同的或式 I 肽的任意组合。

使用如本领域公知的固相蛋白合成法可容易地合成式 I 的肽。本发明的固相蛋白合成方案使用普通保护基团和脱保护方案。无论目前本领域前沿的固相肽合成法的常规性质如何, 本发明者推荐三篇有关固相合成的文献以便于本发明的实践。

如果技术人员不能设计出优选的条件及合成方案, G. Barany 等 International Journal of Peptide and Protein Research, 30:705 - 739 ( 1987 ); J. M. Stewart 和 J. D. Young, SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois ( 1984 ); 和 P. D. Bailey, AN INTRODUCTION TO  
5 PEPTIDE CHEMISTRY, John Wiley & Sons: New York ( 1992 ) 可用于查阅常规保护基团和使用它们的反应条件、脱保护试剂和方案, 裂解试剂和推荐的使用它们的条件等。本发明者使用 Applied Biosystems 自动肽合成仪, 它可完全由制造商增补推荐方案、溶剂、试剂等。实施例中详述了在固相合成中采用的特定方案。

10 为确保充分理解, 现定义本说明书中使用的某些术语和缩略语。术语 “Boc” 指叔丁氧羰基。术语 “甲苯磺酰基 (tosyl)” 是对甲苯磺酰基的缩写。术语 “Chxl” 是环己基的缩写。术语 “2Cl - Z” 是 2-氯苄氧羰基的缩写。术语 “ $C_1 - C_{16}$  羧酸” 指除 “氨基端” 羧酸外具有 1 - 16 个碳的无支链烃。适宜的式 I  $C_1 - C_{16}$  羧酸基团仅是氨基端基团。因此, 出现于  $C_1 - C_{16}$  羧酸中的饱和度和取代度是重要的。  
15 适宜的无环一元羧酸的例子包括: 乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸、十一烷羧酸、十二烷羧酸。如上面讨论的那样, 也可以使用不饱和和无环一元羧酸及取代的饱和的和不饱和的无环一元羧酸。技术人员应认识到任意结构部分固有的伸展性, 它的唯一功能是提供末端。因此本发明包括  $C_1 - C_{16}$  羧酸和上面讨论的变化。

20 式 II 的 LYS 是赖氨酸的缩写。式 I 化合物的亚单位 ( $R^2 - R^{24}$ ) 除  $R^4$  位丙酸和  $R^3$  位 D - Val 外, 通常地是 L - 氨基酸。因此亚单位之间的键是肽键。将式 I 和式 II 肽的终端 ( $R^1 - R^{24}$ ) 定义为氢或羟基, 如果加入另一种氨基酸, 它们会消除肽键的形成。所以, 当  $R^1$  是 H 时, 该 H 不是附加的 H, 它是各个氨基酸或  $R^2$  丙酸的 H。同样, 当  $R^{24}$  是 OH 时, 该 OH 不是附加的 OH, 而是  $R^{23}$  的各个氨基酸的 OH。当  $R^{24}$  是 Ala 或 Ser 时, 存在完整的氨基酸, 如果式 II 化合物合乎要求则羧基端羧酸可用于酰胺键形成。  $R^2$  上的丙酸基可以是正丙酸或异丙酸。

25 优选通过基因工程技术表达式 I 的肽, 该肽由 L 氨基酸组成。利用氨基酸序列和已知的简并遗传密码通过基因工程技术构成表达载体, 能以低成本表达大量的肽, 从而有效地生产仅含天然氨基酸的式 I 的肽。无需浏览分子生物学的进展状态  
30 有关可购得的常规 DNA 序列和用于细菌、酵母和哺乳动物细胞的表达载体的长篇大论。欲实践基因工程生产本发明肽的技术人员可参阅 J. Samrook 等, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, ( 第二版, 1989 ) 和 F. M. Ausubel 等, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, ( 1989 )。上述文献对所有基因工程论述提供了极好的技术补充。

35 适于引发免疫反应的制品是本领域熟知的。完全弗氏佐剂 (CFA) 或许是最熟知的引发理想免疫应答的佐剂。然而, 在完全弗氏佐剂中分枝杆菌的存在和重复



施用 CFA 引起的炎症反应局限了该佐剂在治疗产乳动物中的应用。可利用许多其它天然和合成的油基佐剂，也易于符合本发明的目的。下面简要讨论佐剂。

佐剂被定义为当与抗原同时施用时增强对抗原的免疫应答的任何制品。抗原是干扰宿主免疫系统并导致对侵入物质（抗原）的免疫应答的物质。

5       免疫佐剂的作用机理尚不完全清楚，据信它们可吸引免疫反应性淋巴细胞到抗原沉积部位，将抗原固定于炎症部位（储库作用），延迟抗原的分解代谢，激活反应性细胞的代谢并刺激淋巴细胞相互作用。

佐剂也可以通过几种其它的机理起作用，例如与自体抗原结合并修饰它们，又如弗氏佐剂在水油界面简单地改变它们的构型，或者通过对 T 或 B 淋巴细胞的非特异性刺激。

10       如果不与特异性抗原一起施用，许多佐剂也会非特异性地增强免疫反应性。有效的佐剂包括油、天然盐、双链核酸、微生物产物及许多其它试剂。

最为广为人知的油基佐剂是上面简述的完全弗氏佐剂和非完全弗氏佐剂的变型。这些佐剂由油（或蜡）包水或盐水乳液构成。典型地是将可溶性抗原溶于盐水并在等份油中乳化，所述油例如 Bayol F™（42.5%石蜡，31.4%单环萘和 26.1%多环萘）或 Arlacel（mannite monolate）。灭活分枝杆菌的加入大大增强了佐剂活性，这类佐剂被称为“完全”佐剂，这是相对于不完全佐剂而言的，不完全佐剂没有分枝杆菌。其它微生物产物包括脂蛋白提取物可以替代分枝杆菌。当使用完全佐剂时，已确定分枝杆菌的糖脂类和粘肽部分（wax D）是所见的增强的佐剂作用的主要原因。

20       当皮内或皮下注射时，使用单层乳液佐剂系统的疫苗最为有效。双层乳液（水包油包水）是更“自由流动”的乳液，故可获得更广泛的施用途径。

天然盐是另一种增强致免疫的性的方法，因而使疫苗有效。用天然盐，例如磷酸钙、硅石、明矾（硫酸铝钾或磷酸铝）或矾土霜沉淀的抗原溶液在注射部位及排流注射面积的淋巴结部位产生肉芽肿。该免疫肉芽肿所起的作用与用弗氏佐剂产生的相同。对人使用明矾沉淀的抗原增强了对于抗原例如，白喉类毒素预防接种的免疫应答程度。

不溶性胶性载体是另一类佐剂。除明矾沉淀外，其它胶性载体可以单独使用或和微生物产物或提取物组合与抗原组成佐剂。已经证明血炭（Blood charcoal）在刺激产生抗被吸附抗原的抗体中 useful。可控的聚合物长度的藻酸钙或钠具有佐剂特性。据证明对少量被捕获抗原聚丙烯酰胺凝胶能有效地刺激抗体产生。皂土也被成功地用作佐剂。

当与负电荷的抗原、DNA 或多核苷酸混合产生沉淀时，甲基化牛血清白蛋白和其它正电荷蛋白作为佐剂十分有效。

35       由于它们在佐剂中的用途，简单提及一下微生物提取物。内毒素，例如革兰氏阴性细菌的胞内脂多糖可有效地增强免疫反应。内毒素系统地施用时起佐剂作

用，但当它单独与抗原注射时则更为有效。许多内毒素能刺激抗体合成和 B 细胞增殖，还能提高巨噬细胞的吞噬活性。优选的内毒素包括大肠杆菌 0111: B4 鼠伤寒沙门氏菌 ( *S. typhimurium* ) 多种类型、肠炎沙门氏菌 ( *S. enteritidis* ) 和明尼苏达沙门氏菌 ( *S. minnesota* ) 中的内毒素。分枝杆菌和一些真菌的细胞壁亦可提高免疫反应性。这些物质似乎能吸引和激活巨噬细胞，由此增强抗原诱导的炎症部位的吞噬作用，而后通过辅助细胞增强抗原的显示，接下来促进抗原反应性 B 淋巴细胞的激活并增强细胞介导的 ( T 细胞 ) 作用。

多核苷酸，尤其是双链多核苷酸，例如聚肌胞 ( poly ( IC )) 或聚腺尿 ( poly ( AU )) 是有效的佐剂和免疫刺激剂。它们似乎是通过激活抗原反应性 T 细胞而起作用。多核苷酸也激活巨噬细胞。

卡介苗 ( BCG ) ( *Bacillus calmette guerin* )、小棒杆菌 ( *corynebacterium parvum* )、单核细胞增生利斯特氏菌 ( *Listeria monocytogenes* )、百日咳博得特氏菌 ( *Bordetella pertussis* ) 或这些细菌的提取物都被用作佐剂。左旋四咪唑，一种驱虫药也可用作佐剂，假设这是通过它能激活 T 细胞、提高补体水平和激活巨噬细胞起作用。

佐剂的选择或佐剂的组合完全在普通免疫学技术人员的技术范围之内。上述讨论的佐剂包括用于实验的佐剂和潜在的应用于兽类的佐剂。本发明的乳腺炎疫苗可使用任意上述的佐剂进行配制，还应考虑到佐剂与本发明的肽的任意组合，或佐剂与本发明的肽的任意结合的使用都在本发明的范围之内。

据证明，本发明的乳腺炎疫苗能有效地引发包含抗体的体液应答。它阻断其它的粘附性细菌结合到培养的乳房上皮细胞上。实施例提供了免疫接种和牛乳房上皮细胞/细菌粘附鉴别的方案和具体细节。表 I 表示的数据表明了本发明的乳腺炎疫苗引发体液反应的有效性，该反应抑制金黄色葡萄球菌附着于乳用动物的易变形上皮细胞。

表 1

## 结合抑制百分率

5	对照奶牛	接种前	接种后	加强接种后
	1	0	8	34
	2	11	20	28
	3	12	17	39
10	平均值	8	15	34
	实验奶牛			
	1	10	35	58
	2	21	52	63
	3	0	41	58
15	4	5	54	57
	5	10	38	51
	6	5	36	58
	7	2	46	55
	8	12	40	57
	9	12	36	59
20	10	3	32	52
	11	0	55	54
	12	0	30	53
	13	12	45	57
	14	31	36	55
25	15	17	46	51
	平均值	9	41	56

术语“PRE”(接种前)是指标准化的免疫接种前动物血清阻断粘附的能力。

“POST”反映免疫接种后的水平,“BOOST”值是如实施例中所施行佐剂加强免疫接种后观察到的值。实施例6提供了用于产生表I数据的方法。

本发明的疫苗在乳牛乳腺炎的兽医学管理中特别有用。在乳腺炎疾病状态下细菌对易变形上皮细胞的粘附性特别易受本发明疫苗的影响,因为本发明疫苗阻断细菌粘附的能力会导致细菌在正常挤奶过程中流出。

将上面的讨论及数据主要指向本发明的优选实施方案,该方案是用本发明方法来设计本发明乳腺炎疫苗的用途。技术人员将认识到可将本领域各方面推知到许多其它与细菌粘附相关的领域,因而也应想到本发明的其它应用,并且这些都在本发

明的范围之内。

下面描述的本发明具体实施方案的实施例旨在进一步说明本发明，而不暗示对本发明的范围构成任何限制。

### 实施例 1

#### 5 AVKVAIDGFGRIGRLAFRAIQG - OH 的合成

使用具有下列侧链保护基: Arg ( Tosyl )、Asp ( Chxl ) 和 Lys ( 2-Cl-z ) 的 Boc 氨基酸。将 328 ( 0.25mM ) Boc GlyOCH<sub>2</sub>PAM 树脂 ( Applied Biosystems) 通过双偶合循环装载到通过 Applied Biosystems 430A 肽合成仪上。

10 经 TEA 脱保护循环从完全的肽基树脂上脱除 N - 末端 Boc 基, 然后将树脂转移到 HF 反应容器中, 除去过量溶剂并真空。干燥该树脂, 得 1.03g。加入 1ml 间甲酚, 将该容器连于 HF 装置( HF apparatus )( Peninsula Labs ), 冷至 - 78 °C, 并抽取进约 15ml 液态氟化氢。在冰浴中搅拌该反应 1 小时, 而后真空除去 HF, 残留物悬于 200ml 乙醚。使该固体物质通过 60ml 玻璃多孔过滤漏斗, 用乙醚洗两次。通过将收集物用 15ml 50%乙酸水溶液 ( aq HOAc ) 洗涤两次, 用 15ml 10%  
15 aq HOAc 洗涤两次和 15ml 水洗一次来增溶肽并使之与树脂分离。合并水性滤液, 冻结并冻干。

将冻干物再溶于 15ml 50% aq HOAc、10ml 10% aq HOAc 和 3ml CH<sub>3</sub>CH 中。取出 5  $\mu$ l 该溶液, 用 0.1%TFA 稀释到 500  $\mu$ l, 将 25  $\mu$ l 注射到 0.46  $\times$  15cm VydacC18柱, 使用 FPLC ( Pharmacia ) 系统分析。流速采用 0.5ml/分。室温下进行层析。使用带有 214nm 滤片的 UV 检测器和设置于 FPLC'S 检测器 ( Pharmacia )  
20 的 0.2A 规格检测分离。层析溶液 A 为 0.1% TFA。层析溶液 B 是 0.1% TFA / 50%CH<sub>3</sub>CN;使用的梯度为 50%B、5%B、1%B、40%B、0%B 和 5%B。

在 FPLC 上, 将剩余溶液上 2.2  $\times$  25cm VydacC18柱进行制备性提纯。使用梯度为 25%B50 分钟, 然后在 450 分钟里用 25-65%B。收集 5 分钟 ( 250ml ) 馏  
25 份。使用规格设定为 0.2A 的 FPLC 检测器在 214nm 检测 UV 吸收。用 0.1%TFA 以 1:10 比例稀释第 60 - 74 各馏份的 40  $\mu$ l 样品, 用 HPLC 分析 20  $\mu$ l 每份的样品。合并第 64 - 68 馏份, 冻结并冻干, 得到 112mg。随后对该产物样品进行氨基酸分析和质谱分析。氨基酸摩尔比证实了得到的是目的产物。

快速原子轰击质谱数据表明除目的产物 ( 2315.75 ) 外还有 2 种较高分子量的组份 ( 2375.0 和 2357.4 )。该产物的 HPLC 分析表明纯度高于 90%。  
30

### 实施例 2

#### AVKVAIDGFGRIGRLAFRAIQG-OH 的大规模合成

合成、断裂和纯化基本按实施例 1 的教导进行。在 AVKVAIDGFGRIGRLAFRAIQG - OH 的合成中使用 0.65g ( 0.5mM ) Boc  
35 GlyOCH<sub>2</sub>PAM 树脂, 得到 2.1g 完全的肽基树脂 ( 得到理论重量的 98% )。在断裂中使用 1.5ml 间甲酚和 20ml HF, 冻干所收集固体的水洗液得到 1.06g 粗产物。该

产物的 HPLC 分析表明纯度为约 75%，氨基酸分析表明存在所有预示的残基。氨基酸比例在所期望的粗肽制品的范围之内，但比例的变化性较理想的高一些。质谱分析未测到质量为 2315.75 的产物。缺乏 2315.75MW 产物是由于 7 和 8 位上 Asp-Gly 的存在以及 HF 断裂。

5

### 实施例 3

#### AVKVAIEGFGAIGRLAFRAIQG - OH 的合成

合成、断裂和纯化基本上按实施例 1 进行。该合成中的 7 和 8 位与实施例 2 的反应产物的相应位置不同。选择该肽的 7 和 8 位与 HF 断裂方法具有相容性。将 650mg ( 0.5mM ) Boc GlyOCH<sub>2</sub>PAM 树脂通过目的合成反应装载，该反应中对 Glu<sup>7</sup> 侧链保护使用 Chxl。如实施例 1 在 ABI 430A 肽合成仪上进行双偶合。干燥后得到 2.08g(97%) 肽基树脂。基本按实施例 2 的方法进行 HF 断裂对所收集固体的水洗液进行 HPLC 分析，并且经制备层析纯化剩余的 100ml 水溶液。

10

15

合并馏份 90 - 107，冷冻并冻干，得到 400mg。HPLC 分析表明其纯度为约 95%+。氨基酸比例与理论值一致，质谱分析数据证实了目的分子量 ( 2329.78 ) 产物的存在。

### 实施例 4

#### 多抗原递呈的乳腺炎肽：

#### ( AVKVAIDGFGFRIGRLAFRAIQG )<sub>4</sub>MAPS 4 - 分支的合成

如实施例 1 在 ABI 430A 肽合成仪上使用 Boc 氨基酸进行双偶联，用 1 克 ( 0.5mM ) MAP 4 - 分支 t-Boc 树脂进行同样的固相合成。得到 2.7g 干燥的肽基树脂，在断裂中使用 2ml 间甲酚和 25ml 液态 HF。除去 HF 后用乙醚沉淀，过滤固体，用醚洗涤，通过用 50% aq HOAc、10% aq HOAc 和水洗涤来从所收集固体中提取肽。将合并的水洗液冷冻并冻干，得到 830mg。高压液相层析 ( HPLC ) 分析表明仅有一宽峰，氨基酸分析得到的比例在理论值的 68%-127% 范围内。发现蛋白含量为 36%。使用该产物而进行免疫接种无需进行另外的纯化/特征鉴别。

20

25

### 实施例 5

#### 疫苗的配制

将本发明优选的疫苗制成双层乳液 ( 水包油包水 )。把所需量的优选肽溶于含 0.5% CaCl<sub>2</sub> 的无菌磷酸缓冲盐水 ( PBS ) 中，并用带微量附属装置 ( Micro attachment ) 的 Omni Corp 混合器在等体积的 CFA ( Difco ) 中进行乳化。使用冰浴以防止对肽的热损伤。一种可选择性的乳化方法是使用两支玻璃注射器和一个 Leur 锁阀，在两支注射器之间重复转移乳液。无论何种方式进行乳化，都应测试乳液抵抗分散到水性介质中的能力。通过将一滴乳液放在水中并观察该乳液的分散来进行测试。如果乳滴在水中稳定数分钟就足够了。

30

35

将在油 ( CFA ) 中乳化的 PBS 的 ( 最初的水相 ) 中的肽而后在等体积的 2% TWEEN<sup>TM</sup> 80 ( Sigma ) 中，用具有微量附属装置的混合器进行乳化。带有 Leur

锁阀的注射器将乳化得同样好。

## 实施例 6

### 免疫接种方法

#### 牛的研究

- 5 在免疫接种开始前，从每只动物获取少量血样。表 I 中提供了作为研究中每只动物的前血值的 PRE。所有的免疫接种由 1ml 指定注射剂组成并且所有注射均是皮下的。对照组动物每次接受 1ml PBS，实验组则接受疫苗。最初的免疫接种由如实施例 5 详述的在修饰的完全弗氏佐剂中乳化的 50mg 优选的肽组成。初始注射后 7 天，每只“实验动物”接受第二次修饰的不完全弗氏佐剂（总体积 1ml）中的
- 10 75mg 皮下注射。实验动物接受修饰的不完全弗氏佐剂中的 100mg 优选肽。初始免疫接种 7 周后，所有实验动物接受 100  $\mu$ g 修饰的不完全弗氏佐剂进行强化免疫接种。采血样并评估可阻断细菌粘附于易变形上皮细胞的抗体的存在。

#### 羊的研究

- 15 对牛进行的研究花费了昂贵的费用，因而在羊中只进行了证明血清转化（对抗本发明的优选肽免疫原的抗体产生）的初步实验。下面给出了免疫接种方法、放血时间和由此得到的结果。

周		1	2	3	4	6	7	8	10
20	注射疫苗	X	X	X	X		X		
	采集血样	X		X	X	X	X	X	X
	细胞分析	8.8		31	37	46	55	56	52
	中百分抑制率								

## 实施例 7

- 25 牛乳房上皮细胞的制备

#### A. 组织获取

- 选择具有正常乳房活性，即没有疾病或外伤的动物。使用捕获栓施行安死术，取下整个乳房。室温下用无菌 0.85% 盐水对该乳房进行全面洗涤。将乳房沿平行于中央韧带对切。获取健康组织。对健康组织的识别需要对该类型组织有一定的熟悉。实际上，实践该方法的技术人员不一定具有这方面的技术，本发明者建议只获取外观是颗粒状的组织。将获取的组织样品切成小片直至组织碎片能通过 20 号（gauge）针头。将组织碎片放在盛有汉氏平衡盐溶液（HBSS）、（GIBCO）的无菌容器中，它补加有庆大霉素和两性霉素 B（50ppm）。HBSS 可以有两种不同形式，一种含有 Mg 和 Ca，不含 Mg 和 Ca 的 HBSS 本文称为 HBSS<sup>-</sup>。熟练技术人员将认识到对获取的样品用含有有效抗生素和抗真菌剂的生理溶液进行外科手术式洗涤是必要的，以减少原代培养中的污染。也可以使用其它盐溶液、抗生素和
- 35

抗真菌剂，这纯粹是选择方式问题。

## B. 组织制备

将 A 步骤中制备的约 100g 组织放在约 400ml 新鲜冰冷的 HBSS 中。在随后的过程中使该组织尽可能地置于冰上并尽快完成这些过程。取小片组织样品放到无菌  
5 皿中，剪碎成均匀糊状。合并剪碎的样品并用冷 HBSS 洗，直至上清液外观不再呈乳状。

## C. 消化过程

制备酶“鸡尾酒”来消化细胞内基质，以游离出单个细胞。将下列组份溶于含有庆大霉素和两性霉素 B 的 400ml HBSS 中来制备酶溶液，胶原酶 - 1.38g;  $\alpha$ -  
10 糜蛋白酶 - 1g; 弹性蛋白酶 - 20mg; 透明质酸酶 - 1g; 大豆胰蛋白酶抑制剂 - 50mg 和牛血清白蛋白 - 10g。上述试剂可从许多生化试剂供应商购得。Sigma Chemical Company 和 Worthington Biochemical 是优选的厂商。

将上面制备的酶鸡尾酒进行无菌过滤并用来消化约 100g 组织。消化过程在约 37 °C 进行约 45 分钟。确切时间根据温度、混合情况、组织碎片大小、酶活性等而  
15 变化。本发明建议按一定时间间隔取出等份的消化混合物并观察到含有多于约 100 个细胞的团块存在。显微镜和血细胞计数仪 (hemocytometer) 可充分满足此目的。

将消化容器从 37 °C 水浴或孵箱中取出 (水浴是优选的，因为相对于孵箱而言它可快速达到热平衡)，使用 20 目筛过滤该液体并将其倾入无菌杯中。如果有  
20 含有多于约 200 个细胞的残余团块，使用橡胶淀帚 (也可以用带有橡胶底的注射器柱塞代替) 进行部分破碎。将消化液重新放入水浴中，仔细检测，得到 50 - 100 个细胞每个团块的腺泡 (acini) 制品。避免过度消化对于制品的存活性及因此的利用性而言是必要的。

将烧杯从水浴中取出并使液体通过无菌 CELLECTOR™ 筛 (20 目)，如果需要  
25 使用淀帚来破碎不能过筛的残余团块。抛弃筛网上剩余组织并将该细胞制品放在离心管中。经离心细胞被沉淀，用 HBSS 洗两次并再悬浮于 Media 199 加 Earl's 盐 (GIBCO)，它含有 20% 胎牛血清和 10% 二甲亚砜，细胞浓度为约  $6 \times 10^6$  个细胞/ml。

## D. 组织储存

30 将 C 步骤的细胞制品分成 1ml 等份溶液并装入 2ml 塑料冷冻管 (Sarstedt, W. Germany)。该管在 - 70 °C 冰箱中预冻 24 小时，然后转入液氮中最终储存。

## 实施例 8

### 结合抑制分析

35

## A. 乳房上皮细胞

合并三个冷冻管的乳房上皮细胞并在 25 °C 用 PH7.2 的 40ml PHS 洗三次。

#### B. 细菌生长

5 将一接种环金黄色葡萄球菌株转移到无菌胰酶解酪蛋白大豆肉汤培养基中于 39 °C 培养 24 小时该菌株已被预先确定粘附于乳房上皮细胞。该细胞通过离心收获并用等体积 PBS 洗一次。洗后，将该细胞以  $10^6$  个细胞/ml 悬浮于 PBS 中。

#### C. 细菌粘附分析

10 将洗过的乳房上皮细胞（0.5ml 的  $10^4$  个细胞/ml 悬浮液）与 B 步骤中制备的 0.5ml 细菌细胞悬浮液在 12 × 75mm 玻璃试管中混合，并在水浴摇床上于 39 °C 孵育 30 分钟。孵育后细胞混合物用 PBS 洗四次并除去任何非粘附细菌。涂片，空气干燥，用革兰氏结晶紫染色 15 秒。通过计数多块涂片上粘附于 25 个乳房细胞的金黄色葡萄球菌数测定粘附于 100 个上皮细胞上的细菌数。

本发明疫苗的有效率部分地通过滴定免疫接种动物血清和相关于稀释品抑制粘附的能力来测定。第 7 页表 1 概括了这些研究数据。